



دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی کرمان  
دانشکده داروسازی و علوم دارویی

پایان نامه دکترای عمومی داروسازی

عنوان:

ایجاد موثارتز در سویه ی مولد آنزیم لیپاز ترموفیل به روش موتاسیون با  
مواد شیمیایی و سپس بهینه سازی اجزای محیط کشت به کمک روش های  
آماري جهت افزایش تولید آنزیم

توسط:

زهرا سهامی

اساتید راهنما:

دکتر حمید فروتن فر

دکتر مجتبی شکیبایی



**Kerman University of Medical Sciences  
Faculty of Pharmacy**

**Pharm. D Thesis**

**Title:**

**Chemically induced mutagenesis of thermophile lipase producing  
bacterial strain and statistical optimization of cultural conditions for  
increasing of lipase production**

**By:**

**Zahra Sahami**

**Supervisors:**

**Dr. Hamid Forootanfar**

**Dr. Mojtaba Shakibaie**

**Winter2019**

**Thesis No: 1069**

-

### خلاصه فارسی

مقدمه: آنزیم لیپاز یکی از انواع آنزیم‌های محلول در آب است که هیدرولیز پیوندهای استری را در سوبستراهای لیپیدی انجام می‌دهد. لیپازهای باکتریایی به شدت تحت تأثیر شرایط محیط و مواد موجود در آن مانند دما، pH، میزان نیتروژن، منابع کربنی، وجود انواع لیپیدها، یون‌های فلزی و میزان هوادهی قرار می‌گیرند. در سال‌های اخیر، به منظور افزایش میزان تولید لیپاز با منشا میکروبی، استفاده از روش‌های القای موتانت و تکنولوژی DNA نو ترکیب، مورد توجه واقع شده است. هدف تحقیق حاضر در گام نخست ایجاد جهش در سویه باکتری *Bacillus atrophaeus* FSHM2 و افزایش بازده تولید آنزیم لیپاز و همچنین بعد از تعیین فاکتورها و شرایط مؤثر محیط کشت در تولید آنزیم لیپاز، طرح یا نقشه آزمایشات توسط روش طراحی آزمایش می باشد. بعد از انجام آزمایشات و تعیین فاکتورهای مؤثر بر تولید لیپاز توسط سویه موتانت مورد نظر، مدل مناسب و شرایط بهینه کشت برای تولید این ماده در مقادیر بیشینه ارائه گردید.

روش‌ها: جهش زایی شیمیایی در سلول‌های *B. atrophaeus* FSHM2 با قرار گرفتن در معرض اتیدیوم برماید با روش اصلاح شده Raju و Divakar انجام شد. از بین تمام فاکتورهای موجود در مقالات منتشر شده درخصوص تولید لیپاز در باکتری‌ها، یازده فاکتور احتمالی واجد بیشترین اثر بر تولید لیپاز به عنوان اجزاء محیط کشت انتخاب شد. طراحی پلاکت برمن جهت انتخاب اجزاء تاثیرگذار محیط کشت بر تولید لیپاز توسط سویه موتانت برتر بکار گرفته شد. بنابراین اثر ۱۱ فاکتور شامل روغن زیتون ( $X_1$ )، گلوکز ( $X_2$ )، ساکارز ( $X_3$ )، مالتوز ( $X_4$ )، عصاره مخمر ( $X_5$ )، اوره ( $X_6$ )، آمونیوم سولفات ( $X_7$ )، تریپتون ( $X_8$ )، سدیم کلراید ( $X_9$ )، کلسیم کلراید ( $X_{10}$ )، زینک سولفات

(X<sub>11</sub>) بررسی شد. به منظور بهینه سازی مولفه‌های متوسط که بر تولید لیپاز ترموآلکالوفیلی توسط موتاسیون شیمیایی *B. atrophaeus* FSHM<sub>2</sub> طراحی پلاکت-برمن Plackett-Bremen Design (PBD) و روش سطح- پاسخ (Response surface methodology) مورد استفاده قرار گرفت. در مرحله اول، اثر یازده عامل بر میزان بهره وری لیپاز تعیین و با استفاده از روش PBD طراحی شده توسط نرم افزار Design Expert 6.0.4 پس از آن، سطوح اجزای اصلی بدست آمده توسط PBD با روش D-optimal RSM بهینه سازی شد.

**نتایج:** در میان پنج موتاسیون انتخاب شده در مرحله ی جهش زایی تنها سه موتانت (EB-5، EB-10 و EB-30) به ترتیب بعد از کشت در محیط کشت مایع نسبت به سویه ی باکتری اولیه ، ترشح لیپاز نسبتاً بالاتر نشان داد. علاوه بر این مشاهده شد که EB-5 موثرترین موتاسیون قادر به تولید U/L ۴۳۰۱/۱ لیپاز است که ۲/۴ برابر از بیشتر از سویه ی بدون تغییر بود با استفاده از مدل انتخاب شده، سطوح بهینه از عوامل کاربردی برای تولید حداکثر لیپاز موتاسیون EB-5 پیش بینی شد که شامل ۰/۵٪ گلوکز، ۵٪ روغن زیتون، ۲٪ مالتوز، ۰/۵٪ سوکروز، ۲/۵ گرم بر لیتر عصاره مخمر، ۲/۵ گرم بر لیتر تریپتون، ۱/۷۵ گرم بر لیتر اوره، ۱/۷۵ گرم بر لیتر آمونیوم سولفات ، ۱ گرم بر لیتر کلسیم کلراید، ۲ گرم بر لیتر سدیم کلراید و ۱ گرم بر لیتر زینک سولفات می باشد. به منظور اعتبارسنجی مدل انتخاب شده، ترکیب پیشنهادی بهینه برای تولید لیپاز (۵ مرتبه) مورد استفاده قرار گرفت. میانگین فعالیت لیپاز این پنج تکرار به میزان  $U/L \ 576/9 \pm 14773$  اندازه گیری شد که در محدوده اطمینان نشان داده شده توسط نرم افزار بود و نیز با نتایج پیش بینی شده  $U/L \ 14824$  توافق مناسب داشت. در مقایسه با سویه باکتری اولیه، تولید لیپاز موتانت EB-5 به میزان ۶/۵ برابر افزایش می یابد.

کلمات کلیدی: آنزیم لیپاز، موتاسیون، بهینه سازی، باسیلوس آتروفوس

## Abstract

**Introduction:** The Lipase enzyme is one of the variety of water-soluble enzymes that hydrolyzes steric bonds in lipid substrates. Bacterial lipases are heavily influenced by the environment and the materials contained in it, such as temperature, pH, Nitrogen, carbon sources, types of lipids, metal ions, and aeration rates. In recent years, the use of mutant induction techniques and recombinant DNA technology has been considered in order to increase the production of microbial-derived lipase. The purpose of this study was firstly to create mutations in the strain of *Bacillus atrophaeus* FSHM2 and increase the production efficiency of lipase enzyme, followed by determination of factors affect on the production of lipase enzyme using the statistical experimental design. After testing and determining the effective factors on the production of lipase by the desired mutant strain, a suitable model and optimum culture conditions are proposed for producing this substance in maximum amounts.

**Methods:** Chemical mutation in *B. atrophaeus* FSHM2 cells was performed with exposure to EtBr by modified Raju and Divakar methods. Among all the factors in the literature on the production of lipase in bacteria, eleven possible factors had the most effect on the production of lipase as a component of the medium. The Plackett-Burman Design was used to select the effective components of the medium for producing superior lipase production. Therefore, the effect of 11 factors included olive oil ( $X_1$ ), glucose ( $X_2$ ), sucrose ( $X_3$ ), maltose ( $X_4$ ), yeast extract ( $X_5$ ), urea ( $X_6$ ), ammonium sulfate ( $X_7$ ), tryptone ( $X_8$ ), sodium chloride ( $X_9$ ), calcium chloride ( $X_{10}$ ), zinc sulphate ( $X_{11}$ ) was investigated. In order to optimize the moderate components that were used to produce thermophilic lipophilic lipase by *B. atrophaeus* FSHM2, PBD and RSM was applied. In the first step, the effect of eleven factors on the amount of lipase production was determined and using the PBD method, designed by Design Expert 6.0.4 software, after that, the main components obtained by PBD were optimized with the D-optimum RSM method.

**Results:** Among five selected mutants attained in this step only three mutants (EB-5, EB-10, and EB-30) represented significantly higher lipase secretion after cultivation in submerged culture compared to that of wild bacterial strain. In addition, it was observed that EB-5 was the most efficient mutant able to produce 4301.1 U/L of lipase which was 2.4-fold of untreated control. Using the selected model, optimal levels of the applied factors were obtained for generating maximum EB-5 mutation lysis, which included 0.5% glucose, 5% olive oil, 2% maltose, 0.5%

sucrose, 2 g/L yeast extract, 2.5 g/L tryptone, 1.75 g/L urea, 1.75 g/L ammonium sulfate, 1 g/L calcium chloride, 2 g/L sodium chloride and 1 g/L Zinc sulfate. In order to validate the selected model, an optimal proposed combination for the production of lipase (5 times) was used. The average of the lipase activity of these five repeats was measured at a rate of  $14773 \pm 576.9$  U/L, which was in the confidence range shown by the software and was also consistent with the predicted 14824 U/L results. Compared to the primary bacterial strain, the production of EB-5 Lipase mutant increases by 6.5 times.

**Key words:** Lipase enzyme, Mutation, Optimization, *Bacillus atrophaeus*



دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی کرمان

دانشکده داروسازی

بایان نامه خانم زهرا سهامی دانشجوی داروسازی ورودی ۹۱ به شماره : ۱۰۶۹

نحت عنوان:

"ایجاد موثرتر در سویی مولد آنزیم لپاز تریموکیل به روش مونتاین با مواد شیمیایی و سپس بهینه سازی اجزای محیط

کشت به کمک روش های آماری جهت افزایش تولید آنزیم"

استاد راهنما:

۱- دکتر حمید فروتن فر

۲- دکتر مجتبی شکیلی

هیئت محترم داوران به ترتیب حروف الفبا:

۱- دکتر باقر امیرحیدری

۲- دکتر صالحه صبوری

۳- دکتر داوود کلانتر

۴- دکتر مهدیه نظری

در تاریخ ۹۷/۱۲/۱۹ مورد ارزیابی قرار گرفت و با نمره (با عدد) ۱۸٫۹

(با حروف) تصویب شد به تصویب رسید

دکتر یعقوب پورجعانی  
رئیس اداره بایان نامه

دکتر محمود رضا حیدری  
رئیس دانشکده

